

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10155898 A**(43) Date of publication of application: **16.06.98**

(51) Int. Cl

A61L 33/00
C08L 5/00
// A61K 31/725

(21) Application number: **08314643**(22) Date of filing: **26.11.96**(71) Applicant: **TOYOBO CO LTD**

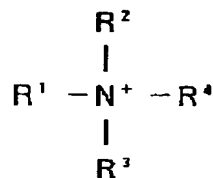
(72) Inventor:
YOKOTA HIDEYUKI
SEKO MASAHIRO
KADOTA NORIKO
ARIMORI KANA
TANAKA MASAKAZU

(54) ANTIMICROBIAL PROPERTY-IMPARTING
ANTITHROMBOTIC MATERIAL

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To improve simplicity, versatility, a property to maintain an antithrombotic property for a long period of time and an antimicrobial property by incorporating at least one kind of mucopolysaccharides, a quaternary ammonium ionic composite, an inorg. antimicrobial agent and an org. high-molecular material into the subject material.

SOLUTION: The mucopolysaccharides, such as heparin, the quaternary ammonium, ionic composite, the org. high-molecular material, such as vinyl polyhalide, and at least one kind of the inorg. antimicrobial agents, such as silver, are incorporated into the antimicrobial property-imparting antithrombotic material. In such a case, about 0.1 to 50 pts.wt. of a lipophilic polysaccharide and about 0.1 to 50 pts.wt. inorg. antimicrobial agent are incorporated into 100 pts.wt. org. high-molecular material. The quaternary ammonium ionic composites have the structure expressed by the formula and one kind or several kinds may be mixed. In the formula, R¹ to R³ denote each a 1 to 12C alkyl group or a 6 to 12C aryl group, a 7 to 20C aralkyl group, R⁴ groups denote 1 to 25C alkyl groups which may be respectively same or different. The excellent antithrombotic and antimicrobial properties are obtd. by this constitution.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-155898

(43) 公開日 平成10年(1998) 6 月16日

(51) IntCl.⁶
A 6 1 L 33/00
C 0 8 L 5/00
// A 6 1 K 31/725

識別記号

A C B

F I

A 6 1 L 33/00
C 0 8 L 5/00
A 6 1 K 31/725

T

A C B

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平8-314643
(22) 出願日 平成 8 年(1996) 11 月26日

(71) 出願人 000003160
東洋紡績株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 2 番 8 号
(72) 発明者 横田 英之
滋賀県大津市堅田二丁目 1 番 1 号 東洋紡
績株式会社総合研究所内
(72) 発明者 世古 政弘
滋賀県大津市堅田二丁目 1 番 1 号 東洋紡
績株式会社総合研究所内
(72) 発明者 門田 典子
滋賀県大津市堅田二丁目 1 番 1 号 東洋紡
績株式会社総合研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗菌性付与抗血栓性材料

(57) 【要約】

【課題】 簡便性、汎用性に加え長期間の抗血栓性と優れた抗血栓性を発揮することが可能な抗菌性付与抗血栓性材料を提供する。

【解決手段】 少なくとも 1 種のムコ多糖類と第 4 級アンモニウムイオンのイオン性複合体、無機系抗菌剤、有機高分子材料を含有することを特徴とする抗菌性付与抗血栓性材料。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記 (a)、(b) および (c) を少なくとも含有することを特徴とする抗菌性付与抗血栓性材料。

(a) 少なくとも 1 種のムコ多糖類と第 4 級アンモニウムイオン性複合体から成る脂溶化ムコ多糖

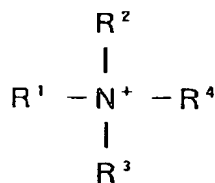
(b) 無機系抗菌剤

(c) 有機高分子材料

【請求項 2】 ムコ多糖類としてヘパリンもしくはヘパリン金属塩が少なくとも含有されている請求項 1 記載の抗菌性付与抗血栓性材料。

【請求項 3】 第 4 級アンモニウムが下記化 1 の構造である請求項 1 または 2 記載の抗菌性付与抗血栓性材料。

【化 1】



化 1 において、 R^1 、 R^2 、 R^3 は炭素数 1～12 のアルキル基、または炭素数 6～12 のアリール基、または炭素数 7～20 のアラルキル基、 R^4 は炭素数 1～25 のアルキル基で、それぞれ同じでも異なってもよい。

【請求項 4】 有機高分子材料がポリハロゲン化ビニル、ポリハロゲン化ビニリデン、ポリウレタン、ポリウレタンウレア、ポリエステルもしくはポリアミドのうちのいずれかである請求項 1～3 のいずれかに記載の抗菌性付与抗血栓性材料。

【請求項 5】 有機高分子材料 100 重量部に対して脂溶化ムコ多糖が 0.1～50 重量部および無機系抗菌剤が 0.1～50 重量部含有されている請求項 1～4 のいずれかに記載の抗菌性付与抗血栓性材料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はムコ多糖類と第 4 級アンモニウムイオン性複合体、無機系抗菌剤および有機高分子材料を必須成分として少なくとも含有して成る抗菌性付与抗血栓性材料に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 加工性、弾性、可撓性に優れた人工材料は、近年医療用材料として広く利用されるようになってきているが、人工腎臓、人工肺、補助循環装置、人工血管等の人工臓器や、注射器、血液バッグ、心臓カテーテル等のディスプレイ製品として今後ますます利用が拡大することが予想される。これらの医用材料としては、十分な機械的強度や耐久性に加えて、生体に対する安全性、特に血液と接触した場合に血液が凝固しないこと、すなわち抗血栓性が要求される。

【0003】 従来、医療用材料に抗血栓性を付与する手法としては、(1) 材料表面にヘパリン等のムコ多糖類やウロキナーゼ等の線溶活性因子を固定させたもの、

(2) 材料表面を修飾して陰電荷や親水性などを付与したもの、(3) 材料表面を不活性化したもの 3 通りに大別できる。このうち (1) の方法 (以下、表面ヘパリン法と略記する) はさらに (A) ポリマーと脂溶化したヘパリンのブレンド法、(B) 脂溶化したヘパリンでの材料表面被覆法、(C) 材料中のカチオン性基にヘパリンをイオン結合させる方法、(D) 材料とヘパリンを共有結合させる方法に細分類される。

【0004】 上記の方法のうち (2)、(3) の方法は長期的に体液と接触した場合には、材料表面にタンパクが吸着して生体膜類似表面を形成し、安定した抗血栓性を得ることが可能である。しかし材料を生体内 (血液接触部位) に導入した初期段階では、生体内において種々の凝固因子等が活性化された状態にあるため、ヘパリン投与などの抗凝血療法を施すことなしに十分な抗血栓性を得るのは困難である。

【0005】 これに対して (1) は導入初期段階には表面上のヘパリンやウロキナーゼによって抗血栓性、または生成した血栓の溶解性能が発揮されるが、長期間の使用によって一般的に性能が低下する傾向にある。すなわち (A)、(B)、(C) では通常、生理条件下での長期の使用によってヘパリン類が脱離し易く、生体内に固定して用いる医療用材料としては十分な性能が得られにくい。(D) で得られる材料では、ヘパリンが共有結合されているため脱離しにくいという利点を有するが、従来の結合方法では往々にしてヘパリン構成成分である D-グルコサミンや D-グルクロン酸のコンフォメーションに変化を与えてしまい、抗凝血効果を低下させてしまうという欠点がある。

【0006】 また (C)、(D) の方法ではヘパリンの固定化に利用できる官能基を含む材料を選択するか、あるいは新たに導入する必要がある。このため、材料の選択の幅が狭められたり、官能基の導入によって材料の機械的強度が低下する可能性がある。また、操作の煩雑化によって、医療用材料を得る工程数が増加するという問題もある。

【0007】 このように、材料の抗血栓化の容易さ、適用できる材料の選択の幅の広さから考えると、(A) ポリマーと脂溶化したヘパリンのブレンド法、もしくは (B) 脂溶化したヘパリンでの材料表面被覆法が最も優れた方法であると言える。しかしながらこの方法の致命的欠点は既述の通り、生理条件下での長期の使用によってヘパリン類が脱離し易いという点である。逆に言えばこの欠点を克服することによって簡便性、汎用性に富む優れた抗血栓化を提供することが可能になる。

【0008】 この問題を解決する手段として、特開平 2-270823 に開示されている方法がある。この方法

は天然ムコ多糖類と天然脂質もしくは合成脂質との複合体を形成させることを特徴としており、ヘパリンと生体内リン脂質の複合体で材料表面を被覆する技術が好ましい例として挙げられている。

【0009】しかしながらこの方法はヘパリン溶出に伴って同時に溶出されるカチオン性物質（脂溶化剤）が天然脂質もしくは合成脂質であるため、生体に悪影響を及ぼしにくい点においてのみ有用であると言える。すなわちこの方法によって、長期間使用時のヘパリンの溶出による抗凝血性の低下が解決されたとはいえない。

【0010】また高栄養輸液カテーテル（以下IVHと略記する）など、長期間体内に留置する必要がある医用デバイスでは生体—材料界面からの感染が問題であった。血液と材料の接触によって生成した血栓に菌が繁殖し、これが体内に入り込んで感染を引き起こす。したがってこのような医用デバイスに使用される材料には抗血栓性と抗菌性を同時に併せ持つことが必要である。抗菌性付与抗血栓性素材が強く望まれていたにもかかわらず、この分野に応用可能な素材はほとんど報告されていないのが現状である。

【0011】一方、抗菌性材料に関しては種々の技術が報告されている。抗菌剤としてアンモニウム塩を含有する抗菌性材料については、例えば特公平4-25301、特公平3-64143、ピグアニドを含有する抗菌性材料に関しては、例えば特公平5-80225、特公平2-61261、特公平3-10341、アクリジン化合物を含有する抗菌性材料については、例えば特公平3-76343などによって開示されている。また、特開平7-82511、特開平7-53316、特開平4-266912、特開平5-310820などではホスホニウム塩を含有する抗菌性材料について開示されている。さらに特公平6-55892ではプロテイン銀を抗菌有効成分として含有する抗菌性材料が開示されている。

【0012】これらの技術では抗菌性は1種の抗菌性物質によって発揮されているため、数多くの菌種に対して十分な抗菌活性を発揮するのは困難である。特にアンモニウム、ホスホニウムを有効成分とする有機系の抗菌剤では、グラム陰性菌に対する効果が不十分であることが多い。またこれらの素材は抗血栓性に対する配慮がなされていないため、長期留置用医用デバイス等に応用可能な抗菌性付与抗血栓性素材として利用するのは困難である。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記従来技術の欠点を解決し、簡便性、汎用性に加え長期間の抗血栓性を発揮することが可能であると同時に、広い抗菌スペクトルを持ち、優れた抗菌性を発揮する抗菌性付与抗血栓性材料を提供することを目的としている。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明の抗菌性付与抗血栓性材料は、少なくとも1種のムコ多糖類と第4級アンモニウムのイオン性複合体、無機系抗菌剤および有機高分子材料を含有して成ることを特徴とする。本発明の抗菌性付与抗血栓性材料は、ムコ多糖類としてヘパリンが少なくとも含有されていることを特徴とする。本発明の抗菌性付与抗血栓性材料は、第4級アンモニウムが前記化1の構造であることを特徴とする。本発明の抗菌性付与抗血栓性材料は、有機高分子材料がポリハロゲン化ビニル、ポリハロゲン化ビニリデン、ポリウレタン、ポリウレタンウレア、ポリエステルもしくはポリアミドのうちのいずれかであることを特徴とする。本発明の抗菌性付与抗血栓性材料は、有機高分子材料100重量部に対して脂溶性ムコ多糖が0.1～50重量部および無機系抗菌剤が0.1～50重量部含有されていることを特徴とする。

10

20

30

40

50

【0015】本発明の抗菌性付与抗血栓性材料の必須成分である第4級アンモニウムは、前記化1の構造を有することを特徴としているが、この第4級アンモニウムは1種類だけ使用しても、何種類かを同時に使用してもよい。第4級アンモニウムの窒素原子に結合する4つの炭化水素鎖のうち、一つは炭素数1～25、好ましくは3～20、さらに好ましくは6～20のアルキル基である。他の3つの炭化水素鎖は炭素数1～12、好ましくは1～8のアルキル基、または炭素数6～12、好ましくは6～10のアリール基、または炭素数7～20、好ましくは7～12のアラルキル基である。

【0016】第4級アンモニウムとしては具体的に、例えばトリブチルラウリルアンモニウム、トリブチルミリスチルアンモニウム、トリブチルセチルアンモニウム、トリブチルステアリルアンモニウム、トリフェニルラウリルアンモニウム、トリフェニルミリスチルアンモニウム、トリフェニルセチルアンモニウム、トリフェニルステアリルアンモニウム、ベンジルジメチルラウリルアンモニウム、ベンジルジメチルミリスチルアンモニウム、ベンジルジメチルセチルアンモニウム、ベンジルジメチルステアリルアンモニウムなどが例示されるが、化1によって示される構造の化合物であれば、これらに限定されない。

【0017】本発明の抗菌性付与抗血栓性材料はムコ多糖類の使用を必須としているが、このムコ多糖類としては、例えばヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸等が挙げられるが、中でもヘパリンもしくはヘパリン金属塩が特に優れた抗血栓性を有しており、また多くの実施例が報告されており好ましい。

【0018】ムコ多糖類と第4級アンモニウムとのイオン性複合体（以下脂溶性ムコ多糖と略記する）を得る方法は特に限定されないが、例えばムコ多糖類の水溶液もしくは水分散液と、第4級アンモニウム塩の水溶液もし

くは水分散液を混合し、得られた沈澱を回収、凍結乾燥する方法などが挙げられる。この際に使用する水に替えて、弱酸性緩衝液を使用することも可能である。緩衝液に使用される溶質としては、例えば2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、ピペラジーン-1, 4-ビス(2-エタンスルホン酸)、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸、N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸、3-(N-モルホリノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸が好ましく、特に好ましくは2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(以下MESと略記する)、ピペラジーン-1, 4-ビス(2-エタンスルホン酸)(以下PIPESと略記する)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(以下MOPSと略記する)である。

【0019】本発明の抗菌性付与抗血栓性材料は脂溶性ムコ多糖のほか、無機系抗菌剤が必須成分として含有される。無機系抗菌剤としては、例えば銀、銅、亜鉛等の金属を有効成分とする抗菌剤や抗菌性ガラス等が使用できる。銀を有効成分とする抗菌剤として具体的には、例えば銀ゼオライト、銀-リン酸ジルコニウム複合体、銀セラミックスなどを利用することが可能である。またプロテイン銀やスルファジジン銀など、金属の有機化合物錯体も本発明において無機系抗菌剤として使用することが可能である。これらの無機系抗菌剤のうち、本発明においては銀系抗菌剤もしくは抗菌性ガラスが好ましく用いられ、中でも銀ゼオライトがさらに好ましく用いられる。

【0020】本発明においては添加された無機系抗菌剤と、脂溶化剤として機能する第4級アンモニウムとの相乗効果によって、優れた抗菌性、広い抗菌スペクトルを材料に導入することが可能である。

【0021】本発明においては、脂溶性ムコ多糖、無機系抗菌剤および有機高分子材料を必須成分として少なくとも含有して成ることを特徴とする。脂溶性ムコ多糖と無機系抗菌剤が有機高分子材料に導入されることにより高分子材料表面が不活性化すると同時に、一部は高分子材料から徐放することによって抗血栓性、抗菌性が発揮されるものと考えられる。本発明の抗血栓性および抗菌性をもつ医用材料では、重合体と脂溶性ムコ多糖および無機系抗菌剤の親和性により、生体成分との接触によっても脂溶性ムコ多糖、無機系抗菌剤の徐放が制御され、長期間の溶出後も非常に優れた抗血栓性と抗菌性を維持することが可能である。

【0022】本発明の抗菌性付与抗血栓性材料に使用される有機高分子材料としては、具体的に例えばポリハロゲン化ビニル、ポリハロゲン化ビニリデン、ポリウレタン、ポリウレタンウレア、ポリエステル、ポリアミド、

ポリプロピレン、ポリエチレン等従来より使用されている材質、また将来使用されるであろう材質が広く利用できるが、中でもポリハロゲン化ビニル、ポリハロゲン化ビニリデン、ポリウレタン、ポリウレタンウレア、ポリエステル、ポリアミドが好ましく、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリウレタン、ポリウレタンウレアがさらに好ましい。

【0023】通常、ポリ塩化ビニルやポリ塩化ビニリデンには可塑剤として芳香族カルボン酸エステル、または脂肪族カルボン酸エステルが添加されている。特にポリ塩化ビニルにおいてはジオクチルフタレート(以下DOPと略記する)の使用が一般的であるが、このような添加剤の共存は本発明によって制限されない。むしろ、医用材料として要求される加工性、弾性、可撓性等の機械的特性を考慮した場合には、可塑剤を添加するのが好ましい。さらに我々の研究によると、可塑剤を添加した場合にはより一層抗血栓性、抗菌活性が発揮されやすくなる傾向が確認された。詳細な機構は明かではないが、可塑剤の共存によって重合体内での脂溶性ムコ多糖のモビリティが向上し、より活性を発揮しやすいコンフォメーションを取りながら材料-生体成分界面に滲出するためであろうと考えられる。添加量は特に制限されないが、重合体に対して5~100phr、好ましくは10~80phrである。

【0024】本発明において、脂溶性ムコ多糖および無機系抗菌剤を有機高分子材料に導入する場合の添加量は、基材100重量部に対して脂溶性ムコ多糖を好ましくは0.1重量部~100重量部、さらに好ましくは1重量部~50重量部程度の量で添加することが推奨される(以下、基材100重量部に対して添加剤1重量部を加えた場合、添加剤添加量は1phrであると表現する)。また無機系抗菌剤の添加量は基材に対し好ましくは0.1~50phr、さらに好ましくは1~30phr程度の量で添加するのが推奨され、脂溶性ムコ多糖と無機抗菌剤の添加量比は40:1~1:4が好ましく、20:1~1:1がさらに好ましい。

【0025】本発明の抗菌性付与抗血栓性材料はさらに、基材となる他の構造体に導入することも可能である。構造体の素材としては特に限定されるものではなく、例えばポリエーテルウレタン、ポリウレタン、ポリウレタンウレア、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリエステル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート等、従来より使用されている材質、また、将来使用されるであろう材質が広く利用できる。また、既存、および新規の材質からなる血液透析膜、血漿分離膜、吸着剤等の血液処理剤に抗血栓性を付与する目的で導入することも可能である。

【0026】基材への導入方法も特に限定されないが、通常のブレンド法、コーティング法等が適用可能であり、コーティング方法についても、塗布法、スプレー

法、ディップ法等、特に制限なく適用できる。これらの方法のうち、生理活性物質であるムコ多糖類に熟慮歴を与えることのない方法を選ぶことが好ましい。

【0027】詳細な機構は明かではないが、本発明の抗菌性付与抗血栓性材料は生体成分との接触初期段階ではもちろん、接触が長期にわたった後も良好な抗血栓性が維持できる。また、第4級アンモニウムと無機系抗菌剤の相乗効果によって抗血栓性と同時に優れた抗菌性をも導入することができる。このような利点を活かして、本発明の抗菌性付与抗血栓性材料は各種の医療用器具あるいは機器類に使用される素材の抗血栓化に広く適用できる。具体的には、例えば血液透析膜や血漿分離膜およびこれらのコーティング剤、血液中老廃物の吸着用コーティング剤に適用できる。また人工肺用の膜素材（血液と酸素の隔壁）や人工心肺におけるシート肺のシート材料、大動脈バルーン、血液バッグ、カテーテル、カニューレ、シャント、血液回路等広範な分野に用いられ得る。本発明の抗菌性付与抗血栓性材料が抗菌性を同時に有する特長を利用し、従来、生体-材料界面からの感染が問題であったIVHなどに適用することも特に好ましい。

【0028】

【実施例】以下、実施例を用いて本発明を説明するが、本発明は特にこれらに限定されるものではない。

【0029】〈実施例1〉ヘパリンナトリウム塩10.00gをイオン交換水に溶解させ、全量で100mlとした。塩化ベンジルジメチルセチルアンモニウム（以下BDMCA・Clと略記する）16.30gをイオン交換水に溶解させ、全量で163mlとした。双方の溶液を氷冷下で混合し、そのまま4℃で15時間静置して懸濁液を得た。この懸濁液を3300rpmで遠心沈降させて回収し、さらに蒸留水を加え懸濁させた後遠心分離によって沈殿を洗浄する操作を3回繰り返し、その後沈殿を乾燥させてBDMCA・Clとヘパリンの複合体（以下BDMCA-Hepと略記する）を得た。このBDMCA-Hepはベンゼン、DMF、THF、クロロホルム等の有機溶媒に可溶であった。

【0030】市販ポリウレタン（Pellethane（商品名）、以下PUと略記する）をTHFに溶解して5%溶液とした。このPU溶液1000gに対し、上記で得たBDMCA-Hep 5.00g、および市販抗菌剤である銀ゼオライト（品川燃料株式会社製、ゼオミック（商品名）、以下AgZeoと略記する）1.00gを加えて、一様な懸濁液とした。このBDMCA-Hep, AgZeo/PUブレンド懸濁液20gを水平に保った12cm×12cmのガラス板上に均一に載せ、40℃で8時間窒素気流下で乾燥後、40℃で減圧乾燥を15時間行い、厚さ約60μmのフィルムを得た（以下このBDMCA-Hep, AgZeo/PUブレンド材料を材料A、材料Aから得たフィルムをフィルムAと略記す

る）。フィルムAには、BDMCA-Hepが10phr、AgZeoが2phr添加されていることになる。

【0031】上記で得たフィルムA上での血漿相対凝固時間について以下の方法で評価を行った。フィルムAを直径約3cmの円形に切り抜き、直径10cmの時計皿の中央にはりつけた。このフィルム上にウサギ（日本白色種）のクエン酸加血漿200μlを取り、0.025mol/lの塩化カルシウム水溶液200μlを加え、時計皿を37℃の恒温槽に浮かせながら液が混和するように穏やかに振盪した。塩化カルシウム水溶液を添加した時点から血漿が凝固（血漿が動かなくなる時点）までの経過時間を測定し、同様の操作をガラス上で行った場合の血漿凝固に要した時間で割り、相対凝固時間として表した。ただし、ガラス板上での凝固時間の12倍を超えても血漿が凝固しない場合には評価を中断し、相対凝固時間は>12と表した。結果は後記表1に示した。

【0032】材料A懸濁液をTHFで希釈して2%とし、この溶液に40~60メッシュのガラスビーズを30分浸漬した後ガラスフィルターで濾過し、窒素気流下40℃で8時間、40℃で減圧乾燥を15時間行ってガラスビーズ表面に材料Aをコートした。ヒト血清のPBS(-)2倍希釈液1mlにこのコーティングビーズ100mgを浸漬し、穏やかに振盪しながら37℃で30分間インキュベートした。この液をサンプルとしてMayer法(Mayer, M.M., "Complement and complement fixation" Experimental Immunochimistry 2nd Ed. p133~240, C.C.ThomasPublisher, 1961)により溶血補体価(CH50)を測定した。結果は、ビーズを加えない上記希釈血清1mlにおける補体価を100%とし、百分率によって表1に示した。

【0033】フィルムAの抗菌性を以下の方法で評価した。なお、一連の操作は全て無菌的に行った。ブロー液（滅菌生理食塩水で50倍希釈）により、約1×10⁷個/mlの濃度とした緑膿菌液（以下この菌液を菌原液と呼ぶ）を調製した。この菌原液の濃度は、次のように測定した。菌原液を10⁴倍に希釈した後100μlを普通寒天板にまき、24時間後に形成された緑膿菌のコロニー数を計測した。このコロニー数をN個とすると、菌原液の細菌数Cは

$$C = 10^4 \times N / 0.1 = 10^5 \times N \text{ [個/ml]}$$

と示される。この菌原液100μlをブロー液（滅菌生理食塩水で40倍希釈）で希釈して全量で40mlに調製した（以下この液を浸漬原液と呼ぶ）。浸漬原液にあらかじめ5cm×5cmに裁断してEOG滅菌したフィルムA上を浸漬し、37℃で24時間培養した。培養後、浸漬原液を滅菌生理食塩水で10倍系列で10⁴倍まで希釈した（以下10ⁿ倍希釈液と略記する）。それぞれの希釈液100μlを普通寒天培地上にまき、24時間後普通寒天培地上に形成された緑膿菌のコロニー数が30ないし300個のプレートについて計測した。計測して

得られたコロニー数を N_0 個とすると、25cm²フィルムAとの接触後の菌数 N_1 は次の式で与えられる。

$$N_1 = 40 \times 10^3 \times N_0 / 0.1$$

フィルムAと接触する前の菌原液の細菌数は前記Cの通りであり、使用した原液量は100μlであるから、フィルムA接触前の菌数 N_0 、

$$N_0 = 10^4 \times N_1$$

浸漬原液40ml中での25cm²の大きさのフィルムとの接触による $N_0 \rightarrow N_1$ の個数変化を表1に示した。接触によって菌数が減少するということはフィルムの抗菌性が発揮されていることを示す。

【0034】材料AのTHF4%懸濁液を調製し、これに既存の人工肺用ポリプロピレン製多孔質ホローファイバーを浸漬して引き揚げ、40℃で12時間乾燥することによってホローファイバーへのコーティングを行った。このホローファイバーを使用しin vivoで抗血栓性を評価した。実験方法は次の通りである。ペントバルビタール麻酔下でウサギ（日本白色種、♂、2.5～3.0kg）の大腿静脈を剥離して、末梢側を糸で結紮し、糸から2～3cmのところを血管鉗子でクランプした。結紮部分の中樞側を眼下剪刀で血管径の1/4～1/3切

り、そこから試料であるホローファイバーを10cm、中樞側に向かって挿入した。挿入位置から1cmほどのところで、血管外に出ているホローファイバーの端部を縫いつけ、ホローファイバーが流されるのを防止した。切開部分を縫合し、抗生物質を投与して、以後試料を取り出すまで2週間にわたって飼育した。2週間後ヘパリン加ペントバルビタールで麻酔下、正中切開を施し、腹部大動脈より適当なチューブを用いて脱血してウサギを犠牲させた後、ホローファイバーを挿入した部分の血管を切断した。血管を切開してホローファイバーと血管内部を写真に撮るとともに、目視で観察し5段階評価を行った。結果は表1に示した。

【0035】フィルムAをクエン酸加牛血漿に浸漬し、37℃の振盪恒温槽で2週間にわたって溶出を行った。クエン酸加牛血漿は一日おきに交換した。以下、溶出後のフィルムをフィルムA'と呼ぶ。フィルムAと同様の方法でフィルムA'での血漿相対凝固時間、抗菌性について評価を行った。結果は表1に示した。

【0036】

【表1】

		相対凝固時間 (秒×1.00)	補体価	抗菌性 (×10 ⁶ 個/40ml)	in vivo 抗血栓性
実施例 1	A A'	>12 9.9	98% —	6.980 → N.D. 6.980 → N.D.	a —
実施例 2	B B'	>12 9.7	98% —	6.980 → N.D. 6.980 → N.D.	a —
比較例 1	C C'	>12 4.0	96% —	6.980 → N.D. 6.980 → 0.220	b —
比較例 2	D D'	>12 3.6	95% —	6.980 → N.D. 6.980 → 0.250	b —
比較例 3	E E'	>12 5.2	96% —	6.980 → 0.420 6.980 → 1.310	b —
比較例 4	F F'	2.8 3.0	— —	6.980 → N.D. 6.980 → 0.120	c —
比較例 5	G G'	2.7 2.9	— —	6.980 → 7.000 6.980 → 7.100	— —

【0037】表1におけるin vivo 抗血栓性の5段階評価とは次の通りである。

a：血小板凝集、血栓生成、フィブリン生成いずれも観察されない

b：フィブリン生成または血小板凝集は見られるが血栓生成は観察されない

c：フィブリン生成または血小板凝集が見られ血栓生成がわずかに観察される

d：フィブリン生成または血小板凝集が見られ血栓生成 ※50

※がかなり観察される

e：フィブリン生成または血小板凝集が見られ大量の血栓生成が観察される

【0038】〈実施例2〉ヘパリンナトリウム塩10.00gをイオン交換水に溶解させ、全量で100mlとした。塩化ベンジルジメチルラウリルアンモニウム（以下BDMLA・C1と略記する）13.99gをイオン交換水に溶解させ、全量で140mlとした。双方の溶液を氷冷下で混合し、そのまま4℃で15時間静置して懸濁

液を得た。この懸濁液を3300rpmで遠心沈降させて回収し、さらに蒸留水を加え懸濁させた後遠心分離によって沈殿を洗浄する操作を3回繰り返し、その後沈殿を乾燥させてBDMLA・C1とヘパリンの複合体（以下BDMLA-He pと略記する）を得た。このBDMLA-He pはベンゼン、DMF、THF、クロロホルム等の有機溶媒に可溶であった。

【0039】脂溶化ヘパリンをBDMCA-He pからBDMLA-He pに変えた以外は実施例1と同様の方法で、BDMLA-He p, Ag Ze o/PUブレンド材料B、および材料Bから成るフィルムBを得た。この材料BおよびフィルムBを用いて、実施例1と同様の方法で血漿相対凝固時間、補体価、抗菌性、in vivo 抗血栓性を評価した。また実施例1と同様の方法でフィルムBの溶出試験を実施し、得られた溶出フィルムB'の血漿相対凝固時間、抗菌性についても評価した。結果は表1に示した。

【0040】〈比較例1〉実施例1で得たBDMCA-He p 100mgおよびAg Ze o 20mgにベンゼンを加えて全量で100gとし、BDMCA-He p, Ag Ze o/ベンゼン懸濁液を得た。12cm×12cmのPUフィルム上にこの懸濁液3.00gを均一に載せ、40℃で8時間窒素気流下で乾燥後、40℃で減圧乾燥を15時間行ない、厚さ約60μmのフィルムを得た（以下このBDMCA-He p, Ag Ze o/PUコーティングフィルムをフィルムCと略記する）。

【0041】このBDMCA-He p, Ag Ze o/ベンゼン懸濁液でコーティングを行って補体価とin vivo 抗血栓性を、フィルムCを用いて血漿相対凝固時間と抗菌性を実施例1と同様の方法で評価した。また実施例1と同様の方法でフィルムCの溶出試験を実施し、得られた溶出フィルムC'の血漿相対凝固時間および抗菌性についても評価した。結果は表1に示した。

【0042】〈比較例2〉実施例3で得たBDMLA-He p 100mg、およびAg Ze o 20mgにベンゼンを加えて全量で100gとし、BDMLA-He p, Ag Ze o/ベンゼン懸濁液を得た。12cm×12cmのPUフィルム上にこの懸濁液3.00gを均一に載せ、40℃で8時間窒素気流下で乾燥後、40℃で減圧乾燥を15時間行ない、厚さ約60μmのフィルムを得た（以下このBDMLA-He p, Ag Ze o/PUコーティングフィルムをフィルムDと略記する）。

【0043】このBDMLA-He p, Ag Ze o/ベンゼン懸濁液でコーティングを行って補体価とin vivo 抗血栓性を、フィルムDを用いて血漿相対凝固時間と抗菌性を実施例1と同様の方法で評価した。また実施例1と同様の方法でフィルムDの溶出試験を実施し、得られた溶出フィルムD'の血漿相対凝固時間および抗菌性についても評価した。結果は表1に示した。

【0044】〈比較例3〉PUをTHFに溶解して5%

溶液とした。このPU溶液1000gに対し、実施例1で得たBDMCA-He p 5.00gを加えて、均一溶液とした。このBDMCA-He p/PUブレンド溶液20gを水平に保った12cm×12cmのガラス板上に均一に載せ、40℃で8時間窒素気流下で乾燥後、40℃で減圧乾燥を15時間行ない、厚さ約60μmのフィルムを得た（以下このBDMCA-He p/PUブレンド材料を材料E、材料Eから得たフィルムをフィルムEと略記する）。フィルムEには、BDMCA-He pが10phr 添加されていることになる。

【0045】この材料EおよびフィルムEを用いて、実施例1と同様の方法で血漿相対凝固時間、補体価、抗菌性、in vivo 抗血栓性を評価した。また実施例1と同様の方法で実施例1と同様の方法でフィルムEの溶出試験を実施し、得られた溶出フィルムE'の血漿相対凝固時間および抗菌性についても評価した。結果は表1に示した。

【0046】〈比較例4〉PUをTHFに溶解して5%溶液とした。このPU溶液1000gに対し、Ag Ze o 1.00gを加えて、一様な懸濁液とした。このAg Ze o/PUブレンド懸濁液20gを水平に保った12cm×12cmのガラス板上に均一に載せ、40℃で8時間窒素気流下で乾燥後、40℃で減圧乾燥を15時間行ない、厚さ約60μmのフィルムを得た（以下このAg Ze o/PUブレンド材料を材料F、材料Fから得たフィルムをフィルムFと略記する）。フィルムFには、Ag Ze oが2phr 添加されていることになる。

【0047】この材料FおよびフィルムFを用いて、実施例1と同様の方法で血漿相対凝固時間、抗菌性、in vivo 抗血栓性を測定した。また実施例1と同様の方法でフィルムFの溶出試験を実施し、得られた溶出フィルムF'の血漿相対凝固時間および抗菌性についても測定した。結果は表1に示した。

【0048】〈比較例5〉脂溶化ヘパリンを導入していないPUフィルム（フィルムG）を用いて血漿相対凝固時間、抗菌性を測定した。また、実施例1と同様の方法でフィルムGの溶出試験を実施し、得られた溶出フィルムG'の血漿相対凝固時間、抗菌性についても測定した。結果は表1に示した。

【0049】表1に示した結果からわかるように、本発明の抗菌性付与抗血栓性材料は優れた抗血栓性、抗菌性を示しており、溶出後も性能が維持されている。有機高分子材料を含有せずに、フィルム表面に脂溶化ムコ多糖と無機系抗菌剤をコーティングした比較例1、2では、溶出前の性能は比較的良好であるものの、血漿溶出による性能の低下が大きいことがわかる。有機高分子材料を含有しない状態では脂溶化ムコ多糖、無機系抗菌剤は血漿による溶出で剥離しやすく、性能の低下を招いていると考えられる。無機系抗菌剤を添加していない比較例3の材料は、抗血栓性は比較的良好であるが、抗菌性は劣

っており、特に溶出後の抗菌性低下が大きい。脂溶化ムコ多糖が含まれていない比較例4では抗血栓性が著しく劣るのに加えて、抗菌性も本発明の抗菌性付与抗血栓性材料には及ばない。抗血栓性が脂溶化されたヘパリンによって発揮されていることを示すとともに、第4級アンモニウムと無機系抗菌剤の相乗効果によって抗菌性が向上していることも示唆している。

*

*【0050】

【発明の効果】本発明の抗菌性付与抗血栓性材料は、基材となるポリマーに簡便に抗血栓性、抗菌性を付与することができ、その性能は材料調製直後のみならず、長期間の溶出操作後も維持される。したがって、本発明の抗菌性付与抗血栓性材料は医療用材料の抗血栓化、抗菌化を行う材料として優れた適性を有している。

フロントページの続き

(72)発明者 有森 奏

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡
績株式会社総合研究所内

※

※(72)発明者 田中 昌和

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡
績株式会社総合研究所内